

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application number: 84305414.9

(51) Int. Cl.⁴: **C 07 K 15/00**
A 61 K 37/02, C 08 F 222/08

(22) Date of filing: 08.08.84

(30) Priority: 08.08.83 JP 145419/83

(43) Date of publication of application:
10.04.85 Bulletin 85/16

(88) Date of deferred publication of search report: 18.12.85

(84) Designated Contracting States:
AT BE CH DE FR GB IT LI NL SE

(71) Applicant: **KURARAY CO., LTD.**
1621 Sakazu
Kurashiki-City Okayama Prefecture(JP)

(71) Applicant: **YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO. LTD.**
No. 5-1 Nihonbashi-Honcho, 2-chome Chuo-ku
Tokyo(JP)

(71) Applicant: **Kabushiki Kaisha Kayaku (also trading as Kayaku Antibiotics Research Co. Ltd.)**
8-16 Funado, 2-Chome
Itabashi-ku Tokyo(JP)

(71) Applicant: **Maeda, Hiroshi**
631-3, Aza-Tamukae Hotakubohon-Machi
Kumamoto City Kumamoto Pref.(JP)

(72) Inventor: **Maeda, Hiroshi**
631-3, Aza-Tamukae Hotakubohon-Machi
Kumamoto City Kumamoto Pref.(JP)

(72) Inventor: **Kanamaru, Ryunosuke**
13-17, Sakuragaoka 7-chome
Sendai City Miyagi Pref.(JP)

(72) Inventor: **Ishida, Nakao**
5-40, Tsunogoro 1-chome
Sendai City Miyagi Pref.(JP)

(72) Inventor: **Yoshitake, Toshihiko**
2-9, Showa 2-chome
Kurashiki City Okayama Pref.(JP)

(72) Inventor: **Ueda, Minoru**
1364-7, Minatosoyonanzan
Okayama City Okayama Pref.(JP)

(74) Representative: **Woods, Geoffrey Corlett et al,**
J.A. KEMP & CO. 14 South Square Gray's Inn
London WC1R 5EU(GB)

(54) Neocarzinostatin derivatives and a process for manufacturing the same.

(57) Neocarzinostatin derivatives, having excellent anticancer activity, have the formula (A)

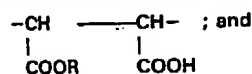
(SMA)-(NCS)-(SMA) (A)

wherein (NCS) represents a divalent neocarzinostatin residue in which a hydrogen atom has been removed from each of the primary amino group of the alanine residue at the N-terminal of neocarzinostatin and of the primary amino group of the lysine residue at the 20th position from the N-terminal of neocarzinostatin and (SMA) represents a monovalent styrene-maleic acid copolymer residue having a weight-average molecular weight of from 800 to 2,500 and consisting of structural units of

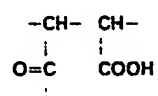
(a) the styrene residue



(b) the maleic acid residue



(c) a residue having the following formula in which a hydroxyl group of one carboxylic group of a maleic acid residue has been removed to provide the link bonding the monovalent styrene-maleic acid copolymer residue to the neocarzinostatin residue





European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

0136792

Application number

EP 84 30 5414

| DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | |
|---|--|--|--|
| Category | Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages | Relevant to claim | CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.4) |
| X,P | EP-A-0 087 957 (KURARAY) * Claims 1, 10, 11 * | 1,3,10 | C 07 K 15/00 A 61 K 37/02 C 08 F 222/08 |
| A,D | US-A-4 182 752 (H. MAEDA et al.) * Claims 1, 2 * | 1,10 | |
| A | CHIMICAL ABSTRACTS, vol. 91, no. 20, 12th November 1979, Columbus, Ohio, USA; J. TAKESHITA et al. "A liophilic derivative of neocarzinostatin. A polymer conjugation of an antitumor protein antibiotic", page 345, column 1, abstract no. 162995j & Int. J. Pept. Protein Res., vol. 14, no. 2, 1979, pages 81-87 | 1,3,10 | |
| | | | TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.4) |
| | | | A 61 K 37/02 C 07 K 15/00 C 08 F 8/32 C 08 F 222/08 |
| The present search report has been drawn up for all claims | | | |
| Place of search BERLIN | | Date of completion of the search 13-08-1983 | Examiner KNAACK M |
| CATEGORY OF CITED DOCUMENTS | | | |
| X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document | | T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document | |

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

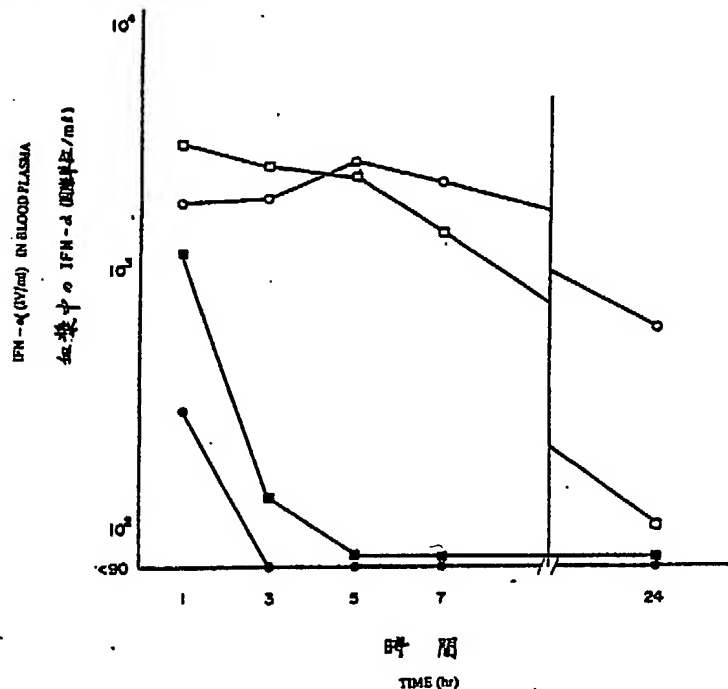
| | | |
|--|-----------|---|
| <p>(51) 国際特許分類³ C07C 103/52, C07G 7/00 C08G 81/00 // A61K 37/02 A61K 37/26, 45/02</p> | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号 WO 85/ 03934</p> <p>(43) 国際公開日 1985年9月12日 (12. 09. 85)</p> |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP84/00085</p> <p>(22) 国際出願日 1984年3月6日 (06. 03. 84)</p> <p>(71) 出願人 成田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP] 〒541 大阪府大阪市東区道修町2丁目27番地 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 西村 紀 (NISHIMURA, Osamu) 〒560 大阪府豊中市東豊中町5丁目2番123-502号 Osaka, (JP) 藤野政彦 (FUJINO, Masahiko) 〒665 兵庫県宝塚市雲雀丘2丁目10番7号 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 天井作次 (AMAI, Sakuji) 〒532 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 成田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 MC.</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> | | |

(54) Title: CHEMICALLY MODIFIED PROTEIN AND PROCESS FOR ITS PREPARATION

(54) 発明の名称 化学修飾蛋白質およびその製造法

(57) Abstract

Chemically modified proteins wherein a group $R-(OCH_2CH_2)_n-$ (wherein R represents a terminal oxygen-protecting group, and n represents an arbitrary positive integer) is directly bound to at least one primary amino group of a physiologically active protein. They are useful as medicines, etc.



(57) 要約

本発明は、生理活性蛋白質の少なくとも１個の一般アミノ基に、
 $R-O-CH_2CH_2-\left[CH_2\right]_n$ 基（Rは末端酸素の保護基，nは任意に変わりうる
正の整数）を直接結合してなる化学修飾蛋白質およびその製造法に關す
るものである。

本発明の化学修飾蛋白質は、医薬品等として有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

| | | | | | |
|----|-----------|----|-------------|----|--------|
| AT | オーストリア | FR | フランス | NL | マリー |
| AU | オーストラリア | GA | ガボン | MR | モーリタニア |
| BB | バルバドス | GB | イギリス | MW | マラウイ |
| BE | ベルギー | HU | ハンガリー | NL | オランダ |
| BR | ブラジル | IT | イタリア | NO | ノルウェー |
| BG | ブルガリア | JP | 日本 | RO | ルーマニア |
| CP | 中央アフリカ共和国 | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | SD | スーダン |
| CG | コンゴ | KR | 大韓民国 | SE | スウェーデン |
| CH | スイス | LI | リヒテンシュタイン | SN | セネガル |
| CM | カメルーン | LK | スリランカ | SU | ソビエト連邦 |
| DE | 西ドイツ | LU | ルクセンブルグ | TD | チャード |
| DK | デンマーク | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| FI | フィンランド | MG | マダガスカル | US | 米国 |

- 1 -

1

明 細 書

化学修飾蛋白質およびその製造法

技 術 分 野

本発明は、化学修飾蛋白質およびその製造法に関する。

5

背 景 技 術

従来から、インスリン、インターフェロン（以下IFNと略記することがある）あるいはインターロイキン-2（以下IL-2と略記することがある）など有用な生理活性蛋白質が知られていたが、近年、遺伝子組め換え技術の発展にともない、これら生理活性蛋白質を大量に合成することが可能になってきた。しかしながら、生体に投与された生理活性蛋白質の生体内におけるクリアランスは、一般に非常に早いことが知られている。また生理活性蛋白質が異種動物から得られたものである場合には、場合により抗体が産生され、重篤な症状を引き起こす危険が予想される。従って、これらを医薬として用いるに際しては、その活性を保持したまま、クリアランスを遅延させ、さらにその抗原性を減弱させる技術の開発が望まれている。この目的を達成するために、生理活性蛋白質を化学的に修飾する方法はきわめて有効な手段である。すなわち化学修飾によって、上記の生体内におけるクリアランスの遅延、抗原性の減弱、さらには生理活性の増強が期待され、生理活性蛋白質の化学修飾の実用的意義はきわめて大きい。

15

生理活性蛋白質の化学修飾を行なうにあたっては、それらの生理活性を保持したまま、化学修飾を行ない得る方法が必要である。ポリエチレングリコールメチルエーテルは、このものの自体が抗原性を有しないと考えられているため、上記の目的の蛋白質の化学修飾に用いられているが、該物質の蛋白質への導入は塩化シアヌルを用いる方法が一般的である。

20



- 2 -

- 1 しかしながら、同時に結合基として導入される塩化シアヌルはそれ自体
安全性に問題があり、かつまたその生体内における分解物の安全性につ
いても解明されておらず、その使用は慎重を期す必要がある。また反応
に際しても、アルカリ側の pH を必要とし、アルカリ性で失活しやすい
5 蛋白質に関しては、本法を適用できない欠点がある。

また、生理活性蛋白質にホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、ベン
ツアルデヒド、ピリドキサールなどの低分子のアルデヒドをホウ素系還
元剤の存在下に導入する方法〔メソッド イン エンザイモロジー、第
47巻、469-478頁(1977)〕；特開昭58-154596
10 号公報〕が知られている。しかしながらこれら公知の物質によっては有
効なクリアランスの遅延化は達成されず、抗原性の低下は期待されない
のみならず、導入された低分子のアルデヒドがハプテンとして作用して
該蛋白質に免疫原性を与える可能性がある。

本発明者らは、これらの欠点を解決すべく、鋭意研究を行ない、本発
15 明を完成した。

発 明 の 開 示

本発明は、生理活性蛋白質の少なくとも1個の一級アミノ基に、
 $R-O-CH_2-CH_2-n$ 基 (I: Rは末端酸素の保護基, nは任意に変わ
りうる正の整数) を直接結合してなる化学修飾蛋白質およびその製造法
20 を提供するものである。

上記生理活性蛋白質に関し、該蛋白質は、遺伝子工学産物、ヒトを含
む各種動物由来のもの、微生物由来のもの、植物由来のもの、合成品い
ずれでもよいが、例えば各種 IFN〔インターフェロン- α (IFN-
 α) ; インターフェロン- β (IFN- β) , インターフェロン- γ
25 (IFN- γ)〕, IL-2, 生長ホルモン, インスリン, ウロキナー



- 3 -

- 1 ぜ、ストレプトキナーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、
アスパラギナーゼ、各種免疫グロブリン、アルブミン、カタラーゼ、ト
リアシン、トリアシンインヒビター、キモトリアシン、リゾチーム、リ
ボヌクレアーゼ、カルボキシペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、各種
5 チトクローム、ウリカーゼ、パパイン、ペプシン、プロメライン、イン
スリン分泌活性化蛋白質(IAP)、ネオカルジノスタチン等が挙げら
れる。とりわけ好ましい生理活性蛋白質として、動物由来のヒトまたは
ブタインシリン、卵白リゾチーム、ウロキナーゼなど、遺伝子組換え技
術で生産される各種IFN(IFN- α , IFN- β , IFN- γ),
10 IL-2などや動物及び微生物由来のSODなどが挙げられる。

生理活性蛋白質の一級アミノ基として、N末端の α -アミノ基および
リジン残基の ϵ -アミノ基が挙げられる。

- 上記(I)で表わされる基に関し、Rで示される末端酸素の保護基と
しては、アルキル、アルカノイルなどが挙げられ、アルキルとして具体
15 的には、C₁₋₁₈のもの、とりわけメチル、エチル、プロピル、i-プ
ロピル、ブチル、i-ブチル、sec-ブチル、t-ブチルなど低級
(C₁₋₄)アルキルが好ましい。アルカノイルとして具体的には、
C₁₋₈のもの、とりわけホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、
i-ブチリルなど低級(C₁₋₄)アルカノイルが好ましい。nで表わさ
20 れる正の整数は、500以下、とりわけ7~120が好ましい。

式(I)で表わされる基の分子量として2.5万以下、とりわけ350
~6000のものが好ましい。

本発明の化学修飾蛋白質は、生理活性蛋白質の一級アミノ基の少なく
とも一部に直接結合した式(I)で表わされる基を有するものである。

- 25 一級アミノ基としてN末端 α -アミノ基のみを有する場合は、そのア



- 4 -

- 1 ミノ基に直接結合した式(Ⅰ)で表わされる基を有するものである。また生理活性蛋白質中に1個以上のリジンを含む場合は、そのε-アミノ基の一部に、好ましくはそれらε-アミノ基の15~80%(平均)に、直接結合した式(Ⅰ)で表わされる基を有するものであり、この場合、N末端α-アミノ基は、直接結合した式(Ⅰ)で表わされる基を有しても、有しなくてもよい。

本発明の化学修飾蛋白質は、例えば生理活性蛋白質と

$$R-(O-CH_2CH_2)_n-O-CH_2CHO \quad (II: R \text{ および } n \text{ は前記と同意義})$$
で示されるアルデヒドとを還元剤の存在下反応させることにより製造する

- 10 ことができる。

本反応に用いるホウ素系還元剤としては、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウムなどが挙げられるが、中でもシアノ水素化ホウ素ナトリウムが反応の選択性の点でより好ましい。

- 15 反応に際しては、アルデヒド(Ⅱ)を生理活性蛋白質に対して、1~10,000倍モル程度、ホウ素系還元剤はアルデヒド(Ⅱ)に対して1~100倍モル程度用いればよく、蛋白質とアルデヒド(Ⅱ)のモル比を増減することによって修飾の程度を任意に選択することができる。反応に用いる溶媒は、反応を妨害しないものであればいずれでもよいが、例えばリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液などの緩衝液が挙げられる。また、
20 蛋白質を失活させず、反応の支障にならない低級アルコール(例、メタノール、エタノール、1-プロパノール)、アセトニトリルなどの有機溶媒を添加してもよい。反応のpHは3~14の広い範囲で可能であるが、中性付近がより望ましい。反応温度は0~80℃で蛋白質が変性しない温度であれば、いずれでもよいが、20~50℃の範囲がより
25 好ましい。反応時間は0.5~72時間、通常は3~30時間程度で十



- 5 -

- 1 分である。反応液は、透析，塩析，イオン交換クロマトグラフィー，ゲル
濾過，高速液体クロマトグラフィー，電気泳動等通常の蛋白質の精製
法で精製し、所望の化学修飾蛋白質を得ることができる。またアミノ基
の修飾の程度は、例えば酸分解のあと、アミノ酸分析を行なって算出す
5 ることができる。

前記したアルデヒド(Ⅱ)は、例えば $R-(O-CH_2CH_2)_n-OH$ (Ⅲ：
Rおよびnは前記と同意義)で示されるエチレングリコール誘導体から
製造できるが、下記の方法は、対応するカルボン酸の調成が少なく有利
な製造法である。

- 10 すなわち、化合物(Ⅲ)を塩化メチレン，クロロホルムなどハロゲン
化アルキル溶媒中、クロルクロム酸ピリジウムで酸化する。この場合、
クロルクロム酸^{ピリジニウム}を化合物(Ⅲ)に対し1～3モル量用い、 $-1.0^{\circ}\sim 50^{\circ}$
 $^{\circ}C$ 、好ましくは室温で、1～30時間反応させる。

- また、化合物(Ⅲ，但し $n=1$)を α -ブタノール中でカリウム α -
15 ブトキシドで処理した後、プロモアセタールを反応させ、ついで有機酸
(トリフルオロ酢酸など)または無機酸(塩酸，硫酸など)などの酸で
処理することにより化合物(Ⅲ)より $-OCH_2CH_2-$ 鎖長の長い対応す
るアルデヒド(Ⅱ)を製造することができる。この場合、まずカリウム
 α -ブトキシドを上記化合物(Ⅲ)に対し10～30モル量を加えて溶
20 解させ、これにプロモアセタールを化合物(Ⅲ)に対し3～15モル量
加えて、 $10^{\circ}\sim 80^{\circ}C$ で0.5～5時間反応させ、常法により後処理後、
上記酸の希薄水溶液に溶かし、5分～2時間加熱する。

上記いずれの反応液も、抽出，濃縮，再結晶，再沈殿，クロマトグラ
フィー，蒸留など通常の化学的処理により精製することができる。

- 25 本発明の化学修飾蛋白質は、対応する公知の非修飾生理活性蛋白質と



- 6 -

- 1 同様の有用な生理活性を有し、医薬品などとして有用である。

本発明の化学修飾蛋白質は、対応する公知の非修飾生理活性蛋白質に比し、生体内におけるクリアランスが遅延され、長時間有効にその活性を示すのみならず、毒性、抗原性も低く、公知の生理活性蛋白質と同様の

- 5 の目的に、同様の用法で安全に使用することができる。

本発明の化学修飾蛋白質は、通常自体公知の担体、稀釈剤等を用い適宜の医薬組成物として経口的または非経口的に哺乳動物（サル、イヌ、ブタ、ウサギ、マウス、ヒト）に投与することができる。

- 10 例えば、本発明の化学修飾 IFN- α を抗ウイルス剤として使用する場合、成人 1 日 1 回 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9$ 国際単位を静注により投与するのがよい。

本明細書中、アミノ酸に関し略号で表示する場合は、IUPAC-IUB (Commission of Biological Nomenclature) による略号に基づくものである。

- 15 図面の簡単な説明

- 第 1 図は実施例 3 (i) に記載したラット血漿中のクリアランス遅延化効果を示す。○（酵素免疫測定法）および□（抗ウイルス活性）は実施例 3 (i) で得た本発明の化学修飾 IFN- α の、●（酵素免疫測定法）および■（抗ウイルス活性）は対照とした rIFN- α A の測定結果をそれぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

以下実施例および参考例によって本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

実施例 1 B1-ポリエチレングリコールメチルエーテル修飾インスリンの調製



- 7 -

- 1 (i) プタインスリン150mgを20mlの水に懸濁し、これに一規定塩
酸を一滴ずつ加え、インスリンを溶解させた。そのうち0.4Mリン酸
緩衝液(pH7.0)20mlを加え、最終的に0.2Mのリン酸緩衝液と
5 アルデヒド(平均分子量5000)1.125gを加え、ついでシアノ
水素化ホウ素ナトリウム100mgを加えて、37°Cで24時間かきまぜ
た。反応液を水に対して12時間透析し、ついで内容物をカルボキシメ
チルセルロースのカラム(3.0×23.0cm)に注いだ。カラムを水
で洗ったのち、水(500ml)と0.2M酢酸アンモニウム緩衝液(pH
10 6.8)の間で、対数勾配をかけて溶出した。主溶出画分(320~
400ml)を集め凍結乾燥した。ついでバイオゲルP-30のゲル透過
に付し、0.1規定酢酸で展開した。主溶出画分(110~150ml)
を集めて凍結乾燥した。収量132mg、成分分解物(6N塩酸, 110°C,
24時間)中のアミノ酸分析値: Lys, 0.92(1); His, 2.12(2),
15 Arg, 1.08(1); Asp, 3.20(3); Thr, 2.11(2); Ser,
2.86(3); Glu, 7.88(7); Pro, 1.11(1); Gly, 3.78(4);
Ala, 2.16(2); Half Cys, 6.08(6); Val, 3.67(4);
Ile, 1.78(2); Leu, 6.17(6); Tyr, 4.04(4); Phe,
2.09(2)
20 プタインスリンの Phe は本来3個であるが、B鎖N末端の Phe が、
ポリエチレングリコールメチルエーテルで修飾され1個少なくなってい
る。またグルコース低下作用はプタインスリンの約50%であった。
- (ii) 参考例1で得た平均分子量1900および750のポリエチレン
グリコールメチルエーテルアルデヒドを用いてプタインスリンを同様に
25 処理し、上記(i)と同じくB鎖のN末端 Phe の α -アミノ基が平均分子



- 8 -

- 1 量1900および750のポリエチレングリコールメチルエーテルで修飾されたインスリン誘導体が得られた。平均分子量1900のポリエチレングリコールメチルエーテル修飾インスリンの酸分解物(6N塩酸, 110°C, 24時間)中のアミノ酸分析値: Lys, 0.98(1); His, 2.09(2); Arg, 1.09(1); Asp, 3.17(3); Thr, 2.04(2); Ser, 2.89(3); Gln, 7.60(7); Pro, 1.09(1); Gly, 3.76(4); Ala, 2.03(2); Half Cys, 3.93(6); Val, 3.27(4); Ile, 1.54(2); Leu, 5.87(6); Tyr, 3.88(4); Phe, 2.00(2)
- 10 平均分子量750のポリエチレングリコールメチルエーテル修飾インスリンの酸分解物(6N塩酸中, 110°C, 24時間)中のアミノ酸分析値: Lys, 1.03(1); His, 2.18(2); Arg, 1.12(1); Asp, 3.30(3); Thr, 2.15(2); Ser, 3.13(3); Glu, 7.83(7); Pro, 1.17(1); Gly, 4.04(4); Ala, 2.24(2); Half Cys, 5.48(6); Val, 3.26(4); Ile, 1.58(2); Leu, 6.30(6); Tyr, 4.03(4); Phe, 2.23(2)
- 15

(Ⅳ) グルコース低下作用は平均分子量1900のポリエチレングリコールメチルエーテル修飾インスリンがブタインスリンの85%, 平均分子量750のポリエチレングリコールメチルエーテル修飾インスリンが100%であった。また上記(i) (ii) および(iii)で得た3種のインスリン誘導体をラットに投与し、血中クリアランスを測定すると、ブタインスリンに比較して、明らかな遅延化が認められた。ブタインスリン抗体に対する反応性も、ポリエチレングリコールメチルエーテルの分子量が大きくなるほど、減弱する傾向が認められた。

- 25 実施例2 ポリエチレングリコールメチルエーテル修飾卵白リゾチーム



1 の調製

(i) 卵白リゾチーム150mgを0.2Mリン酸緩衝液30mlにとかし
参考例1で得た平均分子量550のポリエチレングリコールメチルエー
テルアルデヒド116mgを加え、ついでシアノ水素化ホウ素ナトリウム
400mgを加え、37℃で24時間かきまぜた。ついで反応液を4℃で
水に対して、12時間透析した。透析した液をカルボキシメチルセルロ
ースのカラム(3.0×23.0cm)に注いだ。カラムは水でよく洗っ
たのち、水(500ml)と0.7M酢酸アンモニウム(pH6.8)
(500ml)の間で直線勾配をかけて溶出した。主溶出画分(550~
700ml)を集め、凍結乾燥した。凍結乾燥粉末はバイオゲルP-30
のカラム(2.5×100cm, 展開液0.1N酢酸)でゲル透過を行い
精製した。収量114mg, 酸分解物(6N塩酸, 110℃, 24時間)
中のアミノ酸分析値: Lys, 4.79; His, 0.97(1); Arg,
11.07(11); Trp, 分解(6); Asp, 21.66(21); Thr,
7.25(7); Ser, 9.96(10); Glu, 5.08(5); Pro, 2.04
(2); Gly, 12.62(12); Ala, 12.38(12); Half Cys,
8.47(8); Val, 5.33(6); Met, 1.94(2); Ile, 5.48
(6); Leu, 7.92(8); Tyr, 3.12(3); Phe, 3.03(3)
この結果は、Lys のε-アミノ基の約20%がポリエチレングリコー
ルメチルエーテルで修飾されていることを示している。本品のマイクロ
コッカスラウスの乾燥菌体を用いる溶菌活性は卵白リゾチームの41%
であった。

(ii) 上記の反応でポリエチレングリコールメチルエーテルアルデヒド
の量を385mg, 770mgと増加させると、修飾の割合は各々56%
(酸分解物(6N塩酸, 110℃, 24時間)中のアミノ酸分析値:



-10-

1 Lys, 2.67; His, 1.06(1); Arg, 11.50(11); Trp, 分
解(6); Asp, 22.13(21); Thr, 7.54(7); Ser, 10.62
(10); Glu, 5.32(5); Pro, 2.15(2); Gly, 12.82(12);
Ala, 12.49(12); Half Cys, 7.20(8); Val, 4.82(6);
5 Met, 1.81(2); Ile, 5.11(6); Leu, 8.86(8); Tyr,
3.81(3); Phe, 3.10(3)],

74%〔酸分解物(6N塩酸, 110°C, 24時間)中のアミノ酸分析
値: Lys, 1.59; His, 1.09(1); Arg, 11.36(11); Trp,
分解(6); Asp, 21.92(21); Thr, 7.35(7); Ser, 9.99
10 (10); Glu, 5.45(5); Pro, 2.05(2); Gly, 12.67(12);
Ala, 12.22(12); Half Cys, 8.04(8); Val, 5.14(6);
Met, 1.72(2); Ile, 5.79(6); Leu, 8.26(8); Tyr,
3.91(3); Phe, 3.14(3)〕

と増加し、溶菌活性は14%, 7%と低下した。

15 (Ⅲ) このようにして得られた修飾リゾチームをウサギより得た卵白リ
ゾチーム抗体を用いてその抗原性をしらべると修飾の程度が高くなるほ
ど、卵白リゾチーム抗体との反応性が低下する傾向が認められた。

(Ⅳ) 76%修飾されたものをラットに投与すると、卵白リゾチームに
比較して、明らかなクリアランスの遅延化が認められ、ウサギに投与し
20 ても、抗体の産生はほとんど認められなかった。

(Ⅴ) 平均分子量5000, 1900, 750, 350のポリエチレン
グリコールメチルエーテルアルデヒドを用いて、上記と同様に反応し、
Lysのε-アミノ基の内約20%が修飾されたリゾチームを得ることが
できたが、それらの溶菌活性は各々平均分子量5000のもの0%,
25 1900のもの5%, 750のもの23%, 350のもの34%であっ



1 た。

実施例3 ポリエチレングリコールメチルエーテル修飾IFN- α の調製

(1) IFN- α (rIFN- α A) の溶液5 ml (蛋白質量にして4.8
5 ㎎) をとり、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) + 0.15 M 食塩に対
し、4°C で12時間透析した。透析液を取り出し、これに参考例1で得
たポリエチレングリコールメチルエーテルアルデヒド (平均分子量
1900) (260 ㎎) 、ついでシアノ水素化ホウ素ナトリウム
(140 ㎎) を加え、37°C で40時間かきまぜた。反応液をセファ
10 ックスG-75のカラム (3.0 × 43.0 cm) に注ぎ込み、25 mM
酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0) + 0.15 M 食塩で展開した。5
ml ずつ分取し、目的物を含むフラクション (100 ~ 150 ml) を集め
た。このフラクションの蛋白質含量は牛血清アルブミンを標準としてロ
ーリー (Lowry) 法で測定すると84 μ g/ml であった。また酸分解
15 物 (6 N 塩酸, 110°C, 24時間) 中のアミノ酸分析値は以下の如く
であった。: Asp, 12.2(12); Thr, 10.4(10); Ser, 16.0
(14); Glu, 24.8(26); Pro, 6.0(5); Gly, 6.3(5);
Ala, 8.6(8); Val, 6.5(7); Met, 4.0(5); Ile, 7.6
(8); Leu, 21.0(21); Tyr, 5.2(5); Phe, 9.9(10);
20 Lys, 6.5; His, 3.8(3); Arg, 9.1(9); Cys, Trp, 分
解、rIFN- α A には11個のLys が含まれているので、上記の結
果から、インターフェロン α 中のLysの ϵ -アミノ基の約41%がポ
リエチレングリコールメチルエーテル (平均分子量1900) で修飾さ
れていることが分った。本品は酵素免疫測定法 [メソッド イン エン
25 ザイモロジー, 第79巻, 589-595頁 (1981)] で測定した



- 1 結果 1.51×10^7 国際単位/μg で、ジャーナル オブ ビロロジー、
第 37 巻 755-758 頁 (1981) に記載の方法に従い測定した
抗ウイルス活性は 0.57×10^7 国際単位/μg であった。本品 (IPA
-3) を後述のラットにおけるクリアランスの実験に供した。
- 5 (ii) 参考例 1 で得た平均分子量 750 のポリエチレングリコールメチ
ルエーテルアルデヒド 100 μg, シアノ水素化ホウ素ナトリウム 100
μg を用いて、(i) と同様に rIFN-α を処理すると $130 \mu\text{g/ml}$ の
蛋白質量のポリエチレングリコールメチルエーテル修飾 IFN-α の溶
液 30 μl が得られた。酸分解物 (6N 塩酸, 110°C , 24 時間) 中の
10 アミノ酸分析値は以下の如くであった。: Asp, 12.1(12); Thr,
10.1(10); Ser, 13.6(14); Glu, 26.7(26); Pro, 5.5
(5); Gly, 5.6(5); Ala, 8.4(8); Val, 6.7(7); Met,
5.5(5); Ile, 7.4(8); Leu, 21.0(21); Tyr, 5.1(5);
Phe, 9.6(10); Lys, 4.7; His, 3.5(3); Arg, 9.1
15 (9); Trp, 1.8(2); Cys, 分不 この結果から、本品は約 57
% の Lys の ε-アミノ基が修飾されており、(i) と同様に酵素免疫法で
測定した結果 5×10^6 国際単位/μg で、抗ウイルス活性は $0.14 \times$
 10^8 国際単位/μg であった。
- (iii) 参考例 1 で得た平均分子量 750 のポリエチレングリコールメチ
20 ルエーテルアルデヒド 27 μg, シアノ水素化ホウ素ナトリウム 27 μg を
用いて (i) と同様に処理すると、 $45 \mu\text{g/ml}$ の蛋白質量のポリエチレン
グリコールメチルエーテル修飾 IFN-α 50 μl が得られた。酸分解物
(6N 塩酸, 110°C , 24 時間) 中のアミノ酸分析値は以下の如くで
あった。: Asp, 13.6(12); Thr, 10.4(10); Ser, 14.9(14);
25 Glu, 26.6(26); Pro, 5.5(5); Gly, 6.1(5); Ala,

-13-

- 1 8.3(8); Val, 6.6(7); Met, 5.2(5); Ile, 7.4(8);
Leu, 21.0(21); Tyr, 5.3(5); Phe, 10.2(10); Lys,
9.0; His, 3.6(3); Arg, 9.1(9); Trp, 2.3(2); Cys,
分解 この結果から、本品は約18%のLys のε-アミノ基が修飾さ
5 れており、(I)と同様に酵素免疫法で測定した結果 1.09×10^8 国際
単位/μgで、抗ウイルス活性は 1.53×10^8 国際単位/μgであった。

- (M) 上記(I)で得た本発明の化学修飾IFN-α (IFA-3)を、
 1.274×10^8 単位づつ、雌性7週令のSDラットの大腿部筋肉に
1群3匹づつ注射した。一定時間後に、尾部静脈より採血し、血漿中の
10 IFN-α力価を実施例3(I)に記載の酵素免疫法および抗ウイルス活性
により測定した。非修飾のインターフェロンα (rIFN-αA)を
 1.259×10^8 単位づつを投与した群に比較して明らかなクリアラ
ンスの遅延化が認められた。

これらの結果を第1図に示す。

15 実施例4

- 実施例3(I)で得た本発明の化学修飾IFN-α (IFA-3)の溶液
5 mlに250 μgのヒト血清アルブミンを加えて溶かす。本溶液をメンブ
ランフィルター(ポアサイズ: $0.2 \mu m$)で濾過し、5個のバイア
ルに小分けする。無菌的に凍結乾燥して保存し、使用直前に注射用蒸留
20 水1 mlに溶かして使用に供する。

参考例1 ポリエチレングリコールメチルエーテルアルデヒドの合成

- (I) ポリエチレングリコールメチルエーテル(5 g, 平均分子量
5,000)を塩化メチレン(100 ml)に溶かし、クロムクロム酸ピリ
ジニウム(330 μg)を加え、室温で12時間かきまぜた。反応液を2
25 倍量の塩化メチレンでうすめて、フロリジルのカラム($6 \times 10 cm$)に



- 1 注ぎ込み、カラムを塩化メチレン、ついでクロロホルムで洗ったのち、
メタノール-クロロホルム(1:9)で溶出した。2,4-ジニトロフ
エニルヒドラジンテストで陽性の画分を集めて、溶媒を減圧留去し、結
晶性のワックスを得た。収量1.5g(30%),薄層クロマトグラフ
5 イー:Rf=0.08(クロロホルム:メタノール:酢酸=9:1:
0.5, シリカゲル), ^{13}C -NMRで96.2 PPM に水和した型
($-\text{CH}(\text{OH})_2$) でアルデヒド基の吸収を認めた。

- (II) ポリエチレングリコールメチルエーテル(10g, 平均分子量
5,000)を三級ブタノール(100ml)に溶かし、カリウム三級ブト
10 キシド(4.17g)を加え、ついでブロムアセタール(2.56ml)
を加え、40°Cで2時間かきまぜた。三級ブタノールを減圧下留去し、
残留物に水を加え、ついでクロロホルム(200ml×2)で抽出した。
水で洗い、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。クロロホルムを減圧下留去
し、残留物に石油ベンゼンを加え、生ずる結晶性残渣を濾取し、エーテ
15 ルで洗浄を対応するポリエチレングリコールメチルエーテルジエチルア
セタール9.5g(95%)が得られた。この内5gを取り、0.05
Mトリフルオロ酢酸50mlに溶かし、沸とう水中で30分間処理したあ
と凍結乾燥し、(I)で得たものよりも $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2$ だけ鎖長の長いポリエ
チレングリコールメチルエーテルアルデヒドが得られた。

- 20 (III) ポリエチレングリコールメチルエーテル(5.7g, 平均分子量
1900)を塩化メチレン(100ml)に溶かし、クロムクロム酸ピリ
ジニウム(970mg)を加え、室温で12時間かきまぜた。反応液を塩
化メチレンで希釈し、フロリジルのカラム(6.0×10.0cm)に注
ぎ込み、カラムを塩化メチレン、ついでクロロホルムで洗ったあと、
25 10%メタノール/クロロホルムで溶出した。2,4-ジニトロフェニ

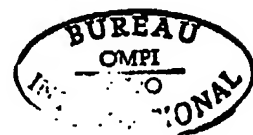


-15-

- 1 ルヒドラジンテストで陽性の画分を集めて、溶媒を留去すると結晶性の
ワックスを得た。収量1.8g(30%)、薄層クロマトグラフィ-：
Rf=0.10(クロロホルム：メタノール：酢酸=9：1：0.5、シリ
カゲル) ^{13}C -NMRで96.2 PPM に水和した形($-\text{CH}(\text{OH})_2$)
5 でアルデヒド基の吸収を認めた。
- (V) ポリエチレングリコールメチルエーテル19.5g、平均分子量
1900)を三級ブタノール(100ml)に溶かし、カリウム三級ブト
キシド(10.4g)を、ついでブロムアセタール(6.4ml)を加え、
40°Cで2時間かきまぜた。三級ブタノールを減圧で留去し、残留物に
10 水を加え、ついでクロロホルム(200ml×2)で抽出した。反応液を
水洗、ついで無水硫酸ナトリウムで乾燥した。クロロホルムを減圧下留
去し、残留物に石油ベンジンを加え、生ずる結晶性残留物を回収し、エ
ーテルで洗浄しアセタール8.5g(89.5%)を得た。この内3g
を0.05Mトリフルオロ酢酸に溶かし、沸とう水中で30分間処理し
15 たあと、凍結乾燥し、(Ⅲ)で得たものよりも $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ だけ鎖長の長い
ポリエチレングリコールメチルエーテルアルデヒドが得られた。
- (V) 平均分子量750, 550, 350のポリエチレングリコールメ
チルエーテルを上記と同様の方法で対応するアルデヒドに導いた。

産業上の利用可能性

- 20 本発明で製造される化学修飾蛋白質は、医薬品等として有用である。



-16-

1 請 求 の 範 囲

1. 生理活性蛋白質の少なくとも1個の一级アミノ基に、

$R-(O-CH_2CH_2)_n$ 基 (Rは末端酸素の保護基, nは任意に変わりうる正の整数) を直接結合してなる化学修飾蛋白質。

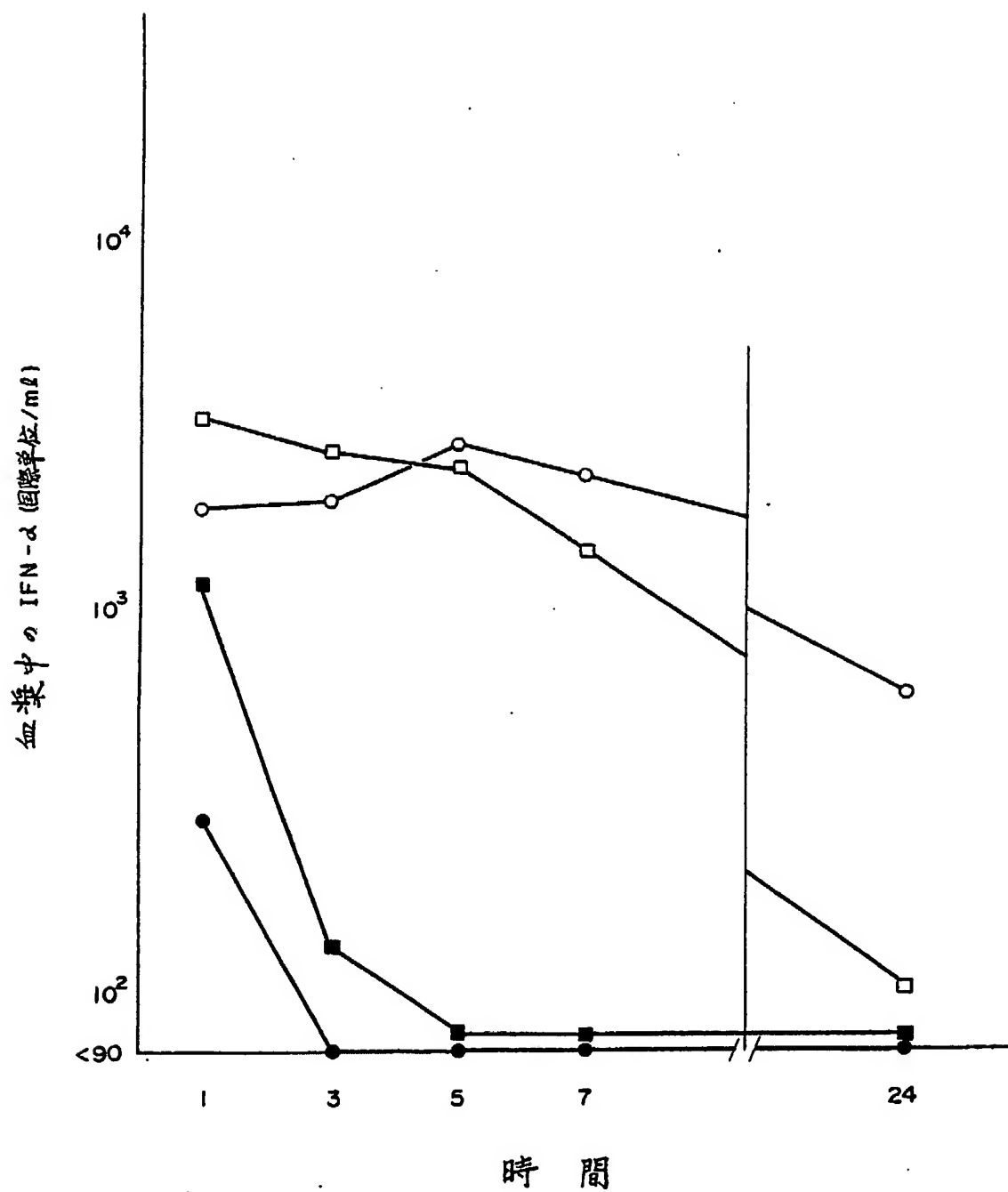
5 2. 生理活性蛋白質と $R-(O-CH_2CH_2)_{n-1}O-CH_2CHO$ (Rおよびnは前記と同意義) で示されるアルデヒドを還元剤の存在下反応させることを特徴とする請求の範囲第1項記載の化学修飾蛋白質の製造法。



図 面

1/1

第 1 図




INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP84/00085

| | | |
|---|--|--|
| I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) * | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC | | |
| Int.Cl. ³ C07C103/52, C07G7/00, C08G81/00// A61K37/02, A61K37/26, A61K45/02 | | |
| II. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum Documentation Searched * | | |
| Classification System | Classification Symbols | |
| IPC | C07C103/52, C07G7/00, C08G81/00 | |
| Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched * | | |
| | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ** | | |
| Category * | Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷ | Relevant to Claim No. ¹⁸ |
| A | JP, A, 58-154596 (Toray Industries, Inc.) 14 September 1983 (14. 09. 83) | 1 - 2 |
| A | JP, A, 50-42087 (Research Corp.) 16 April 1975 (16. 04. 75) & FR, B1, 2313939 & DE, A1, 2433883 & CA, A1, 1033673 | 1 - 2 |
| A | JP, A, 57-192435 (Toyobo Co., Ltd.) 26 November 1982 (26. 11. 82) | 1 |
| <p>* Special categories of cited documents: ¹⁴</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the International filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> | | |
| IV. CERTIFICATION | | |
| Date of the Actual Completion of the International Search ¹ | | Date of Mailing of this International Search Report ² |
| May 18, 1985 (18. 05. 85) | | May 28, 1984 (28. 05. 84) |
| International Searching Authority ¹ | | Signature of Authorized Officer ²⁸ |
| Japanese Patent Office | | |

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PC./JP 84/ 00085

| | | |
|--|--|---|
| I. 発明の属する分野の分類 | | |
| 国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁸ 007C 103/52, 007G 7/00, 008G 81/00, A61K 37/02, A61K 37/26, A61K 45/02 | | |
| II. 国際調査を行った分野 | | |
| 調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料 | | |
| 分類体系 | 分類記号 | |
| I P C | 007C 103/52, 007G 7/00, 008G 81/00 | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行ったもの | | |
| III. 関連する技術に関する文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 請求の範囲の番号 |
| A | JP, A, 58-154596 (東レ株式会社) 14. 9月. 1983 (14. 09. 83) | 1-2 |
| A | JP, A, 50-42087 (リサーチ・コーポレーション) 16. 4月. 1975 (16. 04. 75) & FR, B1, 2313939 & DE, A1, 2433883 & CA, A1, 1033673 | 1-2 |
| A | JP, A, 57-192435 (東洋紡績株式会社) 26. 11月. 1982 (26. 11. 82) | 1 |
| <p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリーの文献</p> | | |
| IV. 認 証 | | |
| 国際調査を完了した日 | 18. 05. 85 | 国際調査報告の発送日 |
| | | 28. 05. 84 |
| 国際調査機関 | 権限のある職員 | 4 H 6 4 6 4 |
| 日本国特許庁 (ISA/JP) | 特許庁審査官 山 川 サツキ |  |